

氏名	アベイデーラ ラランタ ロハーナ		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	学	術	
学位授与番号	博 甲 第 1253 号		
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	STUDIES ON SPERM NUCLEAR TRANSFORMATION IN MATURING BOVINE OOCYTES <u>IN VITRO</u> (牛成熟途上卵子に侵入した精子核の形態的变化に関する研究)		
論文審査委員	教授 丹羽 皓二	教授 湯原 正高	教授 田辺 昭
	教授 内田 仙二	教授 山本 格	

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

牛の未熟卵子に対しても精子は高率に侵入しうるということが明らかにされているが、卵細胞質内における精子核の形態的变化については全く知られていない。

本研究では、1) 未熟卵子に侵入した精子核の形態的变化、2) 精子核の変化に影響およびす要因、3) 精子侵入後の未熟卵子の活性化の可否について検討した。その結果、牛未熟卵子に侵入した精子核は中期象染色体を形成することが明らかとなった。侵入卵のほとんどにおいて精子核の中期象染色体形成が観察されたが、雄性前核の形成は極めて低かった。1個の卵子に5個以上の精子が侵入した場合には卵子の成熟は抑制された。また、このような精子核の中期象染色体形成には成熟促進因子(MPF)の関与していることが明らかになった。卵核胞(GV)期で精子の侵入した卵子の活性化は困難であった。一方、GV崩壊(GVBD)後の卵子は精子侵入によって活性化しうるということが明らかとなった。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、体外授精により牛の成熟途上卵子に侵入した精子核の変化とそれに伴う侵入卵子の活性化について検討して得られた次のような結果をまとめたものである。

1) 成熟途上卵子に侵入した精子核の中期像染色体形成：卵核胞(GV)期の未熟卵子に

凍結融解精子を授精し、8時間後に卵子を10%牛胎仔血清添加TCM-199（成熟培地）に移し、5-40時間培養を継続した。その結果、第二減数分裂中期（M-II）に達した非侵入卵子および侵入卵子の割合は培養時間の延長にともなって増加し、培養後40時間ではそれぞれ70および62%であった。一方、侵入した精子核は、卵子の成熟の進行にともなって脱濃縮および再濃縮を経て分裂中期様の染色体像を形成した。培養後40時間では、侵入卵の86%において中期像染色体を形成した精子核が観察されたが、雌性前核の形成が認められた卵子の割合は極めて低かった（6%）。1個の卵子に5個以上の精子が侵入した場合には卵子の成熟は抑制され、10個以上の精子が侵入した場合には精子核の中期像染色体形成は観察されなかった。

- 2) 成熟途上卵子における精子核の形態的变化におよぼす成熟促進因子（MPF）の影響：GV期の卵子を授精後8時間で、MPFを可逆的に抑制することが知られている6-ジメチルアミノプリン（6-DMAP；2mM）を添加あるいは無添加の成熟培地に移し、15あるいは40時間培養を継続した。その結果、6-DMAP無添加培地においては、精子侵入の有無にかかわらず卵子の成熟は進行し、培養後40時間でM-IIに到達した非侵入卵および侵入卵の割合は、それぞれ65および63%であった。しかし、雌性前核の形成が認められた卵子の割合は極めて低かった（6%）。また、培養後40時間では、侵入卵の90%において中期像染色体を形成した精子核が観察された。5個以上の精子が侵入した卵子では、卵子の減数分裂が抑制された。一方、6-DMAP添加培地においては培養時間の長短にかかわらずすべての卵子の成熟が抑制された。また、精子核の中期像染色体形成は観察されなかった。
- 3) GV期卵子の活性化におよぼす精子侵入の影響：GV期の卵子を授精後8時間で成熟培養に移し、25および40時間培養を継続した。その結果、精子侵入の有無にかかわらず卵子の成熟は進行し、培養後および40時間ではそれぞれ56および63%の卵子がM-IIに到達したが、このような卵子における活性化および前核形成は困難であった（1-4%）。GV期卵子を受精することなく2mM6-DMAPを添加したBO液（受精培地）8時間培養後、成熟培地で40時間培養を継続した場合にも卵子の活性化率は低かった。これに対し、培養後25時間でエタノール処理を行うことにより、培養後40時間における活性化卵子の割合は有意に増加した。また、5個以上の精子が侵入した卵子では、卵子の成熟が抑制された。
- 4) 成熟途上卵子の活性化におよぼす精子侵入の影響：GV期の卵子をmTCM-199で8時間成熟培養後に授精し、8時間後に卵子を再び成熟培養に移して5-40時間培養を継続した。その結果、培養後25時間までは、培養時間の延長にともなって活性化した卵子の割合は有意に増加し、69%に達した。侵入卵における精子核の形態的变化を観察した結果、何れの培養時間においても、精子核は中期像染色体および終期像染色体を経て雌性前核を形成した。

これらの知見は、未熟卵細胞質内での精子核の動態およびそれと卵子成熟との関係について明らかにした初めてのものであり、卵子の成熟機構を理解する上できわめて有用な示唆を与えるものである。本学位審査会は、上記の論文内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士（学術）の学位に値するものと判定した。